

4 1412 865  
日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP 00/03687

07.06.00

#2

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 6月 7日

REC'D 06 OCT 2000

WIPO

PCT

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第159861号

出 願 人

Applicant(s):

北興化学工業株式会社  
財団法人微生物化学研究会

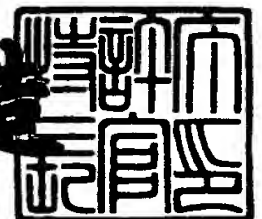
09/980453

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 9月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3075917

【書類名】 特許願

【整理番号】 11209

【提出日】 平成11年 6月 7日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07C

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区宿河原 2 丁目 4 2 番 2 5 - 2 0 1 号

    【氏名】 高橋 篤

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区みたけ台 7 番地 1 6

    【氏名】 神辺 健司

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県厚木市戸田 2 3 8 5 番地 北興化学厚木寮

    【氏名】 森 哲也

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県厚木市戸田 2 3 8 5 番地 北興化学厚木寮

    【氏名】 北 雄一

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県大和市中央林間 5 丁目 1 8 番 4 号

    【氏名】 玉村 健

【特許出願人】

    【識別番号】 000242002

    【氏名又は名称】 北興化学工業株式会社

    【代表者】 山本 佳彦

【代理人】

    【識別番号】 100066452

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 八木田 茂

【選任した代理人】

【識別番号】 100064388

【弁理士】

【氏名又は名称】 浜野 孝雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100067965

【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 哲二

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008796

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9102743

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 L-エピーイノソースの新規製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ミオーイノシトールをL-エピーイノソースへ変換できる変換能を有する微生物をミオーイノシトールに作用させて、前記ミオーイノシトールをL-エピーイノソースへ変換させてL-エピーイノソースを生成することを特徴とする、L-エピーイノソースの製造方法。

【請求項2】 請求項1記載の変換能を有する微生物が細菌であることを特徴とする、請求項1に記載のL-エピーイノソースの製造方法。

【請求項3】 請求項1に記載の変換能を有する微生物がグラム陰性細菌である請求項1に記載のL-エピーイノソースの製造方法。

【請求項4】 使用される微生物がシュードモナダセア (Pseudomonadaceae) 科のキサントモナス (Xanthomonas) 属またはシュードモナス (Pseudomonas) 属の細菌、およびアセトバクテラセア (Acetobacteraceae) 科のアセトバクター (Acetobacter) 属、グルコノバクター (Gluconobacter) 属、及びリゾビアセア (Rhizobiaceae) 科のアグロバクテリウム (Agrobacterium) 属の細菌、およびエンテロバクテリアセア (Enterobacteriaceae) 科のエンテロバクター (Enterobacter) 属、セラチア (Serratia) 属またはエルシニア (Yersinia) 属の細菌、およびパステウレアセア (Pasteurellaceae) 科のパステウレラ (Pasteurella) 属またはヘモフィルス (Haemophilus) 属の細菌から選ばれる細菌であることを特徴とする請求項1に記載のL-エピーイノソースの製造方法。

【請求項5】 請求項1に記載の変換能を有する細菌が、キサントモナス属の細菌AB10119株 (FERM P-17382として寄託) であることを特徴とする、請求項1に記載のL-エピーイノソースの製造方法。

【請求項6】 請求項1に記載の変換能を有する微生物を、ミオーイノシトールならびに炭素源および窒素源を含有する液体培地で好氣的に培養し、培養液中にL-エピーイノソースを生成、蓄積させる工程と培養液からL-エピーイノソースを回収する工程を含む、請求項1に記載のL-エピーイノソースの製造方

法。

【請求項 7】 請求項 1 に記載の変換能を有する微生物の培養で得られた菌体を緩衝液または液体培地中でミオーイノシトールと反応させて L-エピーイノソースを生成させる工程を含む、請求項 1 に記載の L-エピーイノソースの製造方法。

【請求項 8】 ミオーイノシトールを L-エピーイノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所に FERM P-17382 の受託番号で寄託されたキサントモナス・エスピー AB10119 株。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、安価なミオーイノシトール (myo-Inositol) を、原料として用いて、医薬等の原料として価値の高い L-エピーイノソース (L-epi-Inosose) を、化学的合成工程を経ずに微生物の利用により一段階で製造する新規方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

イノソース (Inososes, 別名では Pentahydroxycyclohexanones または Alicyclic ketohexoses) は、一般的にイノシトールの微生物的酸化 (A. J. Kluyver および A. Boezaardt:

「Rec. Trav. Chim.」58 巻 956 頁 (1939))、酵素的酸化 (L. Anderson et al.: 「Arch. Biochem. Biophys.」78 巻 518 頁 (1958))、白金触媒を用いた空気酸化 (K. Heyns and H. Paulsen: 「Chem. Ber.」86 巻、833 頁 (1953))、硝酸等の酸化剤による酸化 (T. Posternak: 「Helv. Chim. Acta」19 巻、1333 頁 (1936)) によって合成されることが知られている。

【0003】

イノシトールのうちの、ミオーイノシトールの微生物的酸化あるいは酵素的酸化で生成するイノソースとしては、これまでシローイノソース (別名: ミオーイノソース-2) が知られている (A. J. Kluyver & A. Boezaardt: 「R c. Trav.

Chim.]

58巻956頁 (1939)、L. Anderson et al.: 「Arch. Biochem. Biophys.」 78巻518頁(1958))のみである。ミオーイノシトールを酸化してL-エピーイノソース (L-epi-Inosose) を生成する活性を有する微生物はこれまで報告されていない。

【0004】

L-エピーイノソースは、D-キローイノシトール (以下、DCIと略す) の合成原料として有用である (米国特許第5,406,005号明細書参照)。このDCIはインシュリン抵抗性糖尿病 (PCT公開W090/10439号公報)、あるいは多嚢胞性卵巣症候群の改善薬 (J.E. Nestler et al: 「New Engl. J. Med.」 340巻, 1314頁 (1999)) としての利用が期待されている。このL-エピーイノソースの製法としては、1 ミオーイノシトールの硝酸による酸化で生成するラセミ体のD, L-エピーイノソース ((±)-epi-Inosose) を、酸化白金触媒で還元してエピーイノシトールを合成し、その後に細菌の一種であるアセトバクター・サブオキシダンス (Acetobacter suboxydans) によるエピーイノシトールの生物的酸化を行うと、L-エピーイノソースが合成されるという報告がある (T. Posternak: 「Helv. Chim. Acta」 29巻, 1991頁 (1946))。また、2 D-グルクロン酸を出発原料にして化学合成したグルコジアルドースを、アシロイン縮合して生成する化合物の一つとしてL-エピーイノソースが合成されるという報告がある (米国特許第5,406,005号)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、これら従来既知のL-エピーイノソースの製造方法はいずれも工業的規模で製造する方法としては、操作の煩雑さ、環境汚染あるいはコスト面で問題があり、必ずしも満足し得るものではない。従って、工業規模で容易にL-エピーイノソースを製造できる方法が求められている。本発明の目的はこのような要望に合致した新しいL-エピーイノソースの製造方法を提供することにある。

【0006】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討を重ねてきた。その結果、安価に入手できるミオーイノシトールに土壌から分離した細菌の新しい菌株 A B 10119株を作用させると、ほぼ選択的にミオーイノシトールの一個所のみの水酸基が酸化（または脱水素）されてイノソースが生成することを見出した。このイノソースを単離し、核磁気共鳴スペクトル装置、質量分析装置、旋光度計などにより機器分析を実施した結果、この物質は光学純度の高い L-エピーイノソースであることが判明した。更に、ミオーイノシトールをエピーイノソースに変換できる活性を有する微生物を広く自然界から探索したところ、グラム陰性細菌、例えばシュードモナダセア (Pseudomonadaceae) 科のキサントモナス (Xanthomonas) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、およびアセトバクテラセア (Acetobacteraceae) 科のアセトバクター (Acetobacter) 属、グルコノバクター (Gluconobacter) 属、およびリゾビアセア (Rhizobiaceae) 科のアグロバクテリウム (Agrobacterium) 属、およびエンテロバクテリアセア (Enterobacteriaceae) 科のエンテロバクター (Enterobacter) 属、セラチア (Serratia) 属、エルシニア (Yersinia) 属、およびパステウレアセア (Pasteurellaceae) 科のパステウレラ (Pasteurella) 属、ヘモフィルス (Haemophilus) 属等に属するところの、分類学的に広範な範囲の細菌において、上記の変換をできる活性を有する菌株が存在することが見出された。

## 【0007】

従って、本発明においては、ミオーイノシトールを L-エピーイノソースへ変換できる変換能を有する微生物をミオーイノシトールに作用させて、前記ミオーイノシトールを L-エピーイノソースへ変換させて L-エピーイノソースを生成することを特徴とする、L-エピーイノソースの製造方法が提供される。

## 【0008】

本発明方法は、具体的には以下に示す実施法 (A) 及び実施法 (B) の2つの方法で行うことができる。

実施法 (A) は、上記の変換能を有する微生物を、ミオーイノシトールならびに炭素源および窒素源を含有する液体培地で好氣的に培養し、培養液中に L-エ

ピーイノソースを生成蓄積させる工程と培養液からＬ－エピーイノソースを回収する工程を含む方法である。

実施法（Ｂ）は、上記の変換能を有する微生物の培養で得られた菌体を緩衝液または液体培地中でミオーイノシトールと反応させ、Ｌ－エピーイノソースを生成させる工程を含む方法である。

【0009】

以下に、本発明方法の実施を具体的に説明する。

本発明において使用する微生物は、ミオーイノシトールをＬ－エピーイノソースに変換する能力を有する微生物であればいずれの菌株でも良い。

【0010】

具体的に例示すると、前述したようにミオーイノシトールからのＬ－エピーイノソース生産菌は多種存在するが、例えば本発明者らが分離したキサントモナス・エスピーAB10119株は本発明に最も有効に使用される菌株の一例である。本菌株の菌学的性質を示すと下記の通りである。

尚、本菌株の同定の当たっては、新細菌培地学講座（第2版、近代出版）、医学細菌同定の手引き（第2版、近代出版）、細菌学実習提要（丸善）に準じて実験を行い、実験結果をBergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1(1984)を参考にして同定した。

【0011】

AB10119株の菌学的性質は下記に示す。

（a）形態的特徴

（1）細胞形態：桿菌で大きさは $0.5\sim 0.7\times 1.5\sim 3.5\mu\text{m}$ 。多形性は無い。

（2）運動性：懸滴法及びSIM培地での本菌の観察の結果では運動性は認められなかった。

（3）普通寒天培地上での生育状態：生育は中程度。コロニー形態は円形、平滑で光沢を帯びる。色調は黄土色～黄色である。

【0012】

（b）生理生化学的性状

（1）グラム染色：

—



(2) OFテスト : 0

(3) 好気条件での生育 : +

(4) 嫌気条件での生育 : -

(5) 生育温度 :

8℃ -

13℃ ±

17℃ +

21℃ +

37℃ +

42℃ ±

47℃ -

(6) 食塩耐性 :

0% +

2% +

5% -

(7) 生育pH :

pH4 -

pH5 ±

pH6 +

pH9 +

pH10 -

【 0 0 1 3 】

(8) 色素の産生 : マニット酵母エキス寒天培地（不溶性色素の検出用）では、菌体が薄い黄土色～黄色に着色した。

King培地B（水溶性色素の検出用）では、寒天中に薄い黄色の色素を産生した。

【 0 0 1 4 】

(9) トロムキナーゼ : -

(10) カラーゼ : +

(11)硝酸塩還元性：	—
(12)硫化水素産生：	—
(13)アセトン産生：	—
(14)ゼラチンの液化：	+
(15) Tween 80の分解：	+
(16)イントールの産生：	—
(17)マロン酸の利用性：	—
(18)ONPG分解性：	+
(19)エスクリンの分解性：	+
(20)デオキシリボヌクレアーゼ活性：	—
(21)クエン酸の利用性：	+
(22)デカルボキシラーゼ活性：	
L-リジン	—
L-アルギニン	—
L-オルニチン	—
(23)尿素分解性：	—
(24)アセトアミド分解性：	—
(25)リトマス乳：	凝固せず。赤色に変化。
(26)澱粉の分解：	—
【0 0 1 5】	
(27)色素および薬剤感受性試験：	
0.01%メチルグリーン	+（感受性のために、生育しない）
0.01%イオン	—
0.01%酢酸鉛	—
【0 0 1 6】	
(28)各種糖類からの酸の生成：	
グルコース	+
キシロース	—
マンノース	+

アラビノース	+
フルクトース	+
マルトース	+
ラムノース	—
マンニトール	—
シュクロース	—
アトニトール	—
ミオ - イノシトール	—
ソルビトール	—
ガラクトース	+
トレハロース	—
セロビオース	+
イヌリン	—
スルシトール	—
サリシン	+
ラクトース	—
グリセロール	—
ラフィノース	—
$\alpha$ - メチル - グルコース	—

【 0 0 1 7 】

(29) 炭素源の資化性：

グルコース	+
セロビオース	+
$\beta$ - ヒドロキシブチレート	—
L-ヒシチジン	+
パントテン酸	—
マルトース	+
ラクトース	—
トレハロース	+

サリシン	—
アスパラギン	—
メチオン	—
ミオ-イノシトール	—

【0018】

以上の通り、AB10119株の主性状は、コロニーが黄色の色素を帯びるグラム陰性の桿菌である。大きさは $0.5\sim 0.7\times 1.5\sim 3.5\mu\text{m}$ であって、グルコースを好氣的に分解し、酸を生成する。カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性である。0.01%のメチルグリーンに感受性であった。

【0019】

これらの菌学的性質を総合して、本菌株はキサントモナス (*Xanthomonas*) 属に属する菌株であると判断した。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1(1984)199頁~210頁によると、キサントモナス属細菌は5種に分類されているが、AB10119株はいずれの種とも、その菌学的性質において完全には合致しなかった新しい菌株である。従って、本菌株を公知のものと区別するため、キサントモナス・エスピー AB10119株と命名し、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-17382として寄託した(寄託日は平成11年5月7日)。

【0020】

次に本法の実施方法(A)を更に具体的に説明する。

実施法(A)では、ミオ-イノシトールを含む液体栄養培地に、上記の変換能を有する微生物を接種して好氣的に培養することにより、L-エピーイノソースを生成して培養液中に蓄積させることができる。

液体培地の組成は、目的に達する限り何ら特別の制限はなく、炭素源、窒素源を含有するに加えて、有機栄養、無機塩類等を配合するのがよい。合成培地または天然培地のいずれも使用できる。炭素源としては、ミオ-イノシトールを0.1%~30%、より好ましくは15~20%添加し、窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムあるいは尿素等を0.01%~1.0%、好ましくは0.05%~0.5%添加するのが望ましい。また、有機栄養源としては、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸等を適当量(0.05%か

ら 5%) 添加するのが望ましい。

【0021】

その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、マンガン、亜鉛、鉄、銅、モリブデン、リン酸、硫酸などのイオンを生成することができる無機塩類を培地中に添加することが有効である。培養液中の水素イオン濃度は pH 4~10、好ましくは pH 5~9 に調整し培養すると、効率よく L-エピーイノソースを得ることができる。

【0022】

培養条件は、使用菌株や培地の種類によっても異なるが、培養温度は 5~40℃、好ましくは 20~37℃ であり、培養期間は 1~14 日、好ましくは 3~10 日である。また、培養は液体培地を振とうしたり、液体培地中に空気を吹き込むなどして好氣的に行えば良い。

【0023】

培養液から目的の L-エピーイノソースを採取する方法は、通常の水溶性中性物質を単離精製する一般的な方法を応用することができる。すなわち、培養液を活性炭や、イオン交換樹脂等で処理することにより、L-エピーイノソース以外の不純物をほとんど除くことができる。その後、再結晶等の方法を用いることにより、目的物質を単離することができる。

【0024】

また、本法の実施法 (B) を更に具体的に説明する。

実施法 (B) では、上記変換能を有する微生物を培養して得られた菌体を、ミオ-イノシトールと緩衝液または液体培地中で反応させ、L-エピーイノソースを生成させるものである。

【0025】

菌体としては、実施法 (A) により得た培養液から分離して集めた菌体を用いてもよく、また、前記微生物を別途適当な培養条件で培養して得たものを用いてもよい。集菌は、培養液から遠心分離、濾過等公知の方法により行えばよい。

【0026】

ミオ-イノシトールを反応させる反応媒質液としては、液体培地または緩衝液

などが用いられる。液体培地としては、実施法（A）におけるものと同様のものを用いてもよく、また別途前記微生物を培養した液体培地をそのまま用いてもよい。緩衝液としては、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド（Good's）のCHES緩衝液等を10～500mM、好ましくは20～100mMの濃度で用いればよい。溶液中のミオーイノシトールの濃度は0.1～30%程度とするのが好ましい。

#### 【0027】

反応条件は、使用菌株や培地、緩衝液の種類によって異なるが、反応温度は5～60℃、好ましくは10～45℃であり、反応時間は1～50時間、好ましくは3～48時間であり、液体培地または緩衝液のpHは2～10、好ましくは3～9である。

#### 【0028】

反応終了後の反応液からの目的のL-エピーイノソースを単離する方法は実施法（A）と同様に行えばよい。本実施法の一例を後記実施例3に示した。

#### 【0029】

##### 【発明の効果】

本発明の製造方法によれば、医農薬合成原料として有用な純度の高いL-エピーイノソースを工業生産規模で安価に製造することができる。

#### 【0030】

##### 【発明の実施の形態】

以下に本発明の実施例を説明する。

##### 実施例1

実施法（A）によるL-エピーイノソースの製造例（1）

##### （1）L-エピーイノソースの生成

ミオーイノシトール 12.0%（360g）、酵母エキス 1.2%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.7%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01%を含むpH7の液体培地3リットルを、100mlずつ500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピー AB10119株（FERM P-17382）を接種し、27℃で3日間振

とう培養した。培養液を遠心分離 (8,000 r p m、20分間) し、得られた上清を培養上清液とした。

この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより下記の条件で分析した。その結果、培養上清液中には L-エピーイノソースが 66mg/ml の濃度で生成していることがわかった (反応収率 55.6%)。

【0031】

なお、上記の L-エピーイノソースの反応収率は、次式により求めた。

【数1】

$$\text{反応収率 (\%)} = \frac{\text{培養上清液 1 ml 中の L-エピーイノソースのモル数}}{\text{培養開始前の培地 1 ml 中の ミオ-イノシトールのモル数}} \times 100$$

【0032】

また、高速液体クロマトグラフィーの分析条件は以下の通りである。

カラム : Wakosil 5NH<sub>2</sub> : 4.6 × 250mm

カラム温度 : 40℃

検出器 : RI DETECTOR ERC-7515A (ERMA CR. INC.)

注入量 : 20 μl

溶媒 : アセトニトリル-水 = 4 : 1

溶出時間 : L-エピーイノソース ; 6.7分

【0033】

(2) L-エピーイノソースの単離

培養上清液を活性炭 300ml を充填したカラム (内径 5 cm、長さ 30 cm) に通過させ、その後このカラムに 600ml のイオン交換脱イオン水を通過させ洗浄した。このカラム通過液及び洗浄液を、強酸性陽イオン交換樹脂デュオライト (登録商標) C-20 (H<sup>+</sup>型) 300ml を充填したカラム (内径 5 cm、長さ 30 cm) に通過させ、その後このカラムに 300ml のイオン交換脱イオン水を通過させて洗浄した。このカラムの通過液及び洗浄液を、強塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト (登録商標) A-113 (OH<sup>-</sup>型) 100ml を充填したカラム (内径 5 cm、長さ 30 cm) に通過させ、その後このカラムに 300ml のイオン交換脱イオン水

を通過させて洗浄した。

こうして得られた通過液及び水洗浄液の合併水溶液中には上記 L-エピーイノソースが含有され、それ以外の不純物はほとんど存在していなかった。

上記により得た水溶液を減圧下で 200 ml まで濃縮し、エタノールを 5 倍量加え 5℃で一晩放置したところ、ほぼ純粋な L-エピーイノソースの結晶 128 g を得た。

この結晶を 100 ml の蒸留水に溶解させ、5 倍量のエタノールを加え、5℃で一晩再結晶した結果、純粋な L-エピーイノソースの無色結晶を 100 g (精製収率 55.5%) 得た。

#### 【0034】

なお、上記 L-エピーイノソースの収率は次式により求めた。

【数 2】

$$\text{精製収率 (\%)} = \frac{\text{精製単離した L-エピーイノソース量}}{\text{培養上清液 3 L 中に含有された単離前の L-エピーイノソース量}} \times 100$$

#### 【0035】

##### 実施例 2

実施法 (A) による L-エピーイノソースの製造例 (2)

##### (1) 種培養物の調製

ミオイノシトール 2.0%、酵母エキス 0.2%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.7%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01% を含む pH 7 の液体培地 100 ml を 500 ml 容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピー AB10119 株を接種し、27℃で 1 日間振とう培養した。この培養液を種培養物とした。

#### 【0036】

##### (2) 4 L 容ジャーファーマンターによる L-エピーイノソースの製造

ミオイノシトール 12.0%、酵母エキス 1.2%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.7%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$



○ 0.01%を含むpH7の液体培地2.5リットルを、4L（リットル）容ジャーファーマンターに分注し、オートクレーブ滅菌した。このジャーファーマンターにキサントモナス・エスピー AB10119株の、上記(1)の方法で調製した種培養物25mlを接種した。この時、培養温度は27℃、通気量は1vvm、回転数は200rpmで培養を実施した。培養は3日間行い、培養期間中のpHを5M NaOH水溶液及び3M HCl水溶液の添加でpH7±0.2に自動調整した。3日間培養後の培養液を遠心分離（8,000rpm、20分間）し、得られた上清を培養上清液とした。

この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより前記と同様の条件で分析した。その結果、培養上清液中にはL-エピーイノソースが60mg/mlの濃度(反応収率50.5%)で生成していることがわかった。

#### 【0037】

反応液からのL-エピーイノソースの単離方法は、実施例1に記載した方法に準じて行って、L-エピーイノソースの結晶として114g（収率76%）を得た。なお、上記L-エピーイノソースの糖製収率は、上記実施例1に準じて次式により求めた。

#### 【数3】

$$\text{精製収率 (\%)} = \frac{\text{精製単離したL-エピーイノソース量}}{\text{培養上清液 2.5L 中に含有された精製前のL-エピーイノソース量}} \times 100$$

#### 【0038】

#### 実施例3

実施法（B）によるL-エピーイノソースの製造例

##### （1）菌体の生産

ミオ-イノシトール 0.5%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.7%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01%を含むpH7の液体培地2Lを500ml容のバッフル付き三角フラスコに100mlずつ分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピーAB10119株を接種し、27℃で3日間振とう培養した。この培養液を遠心分

離して得られた菌体を、0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 200ml で洗淨後、再度遠心分離し、洗淨菌体を得た。

#### 【0039】

##### (1) L-エピーイノソースの製造

上記により得られた洗淨菌体 35g を、ミオーイノシトール 4g を含有した 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 400ml (ミオーイノシトール濃度 10mg/ml) 中に加え、30℃、24時間緩やかにスターラーで攪拌しながら反応させた。反応終了後、反応液を液体クロマトグラフィーにより分析したところ L-エピーイノソースが 6mg/ml の濃度 (反応収率 60.6%) で蓄積していた。

#### 【0040】

反応液からの L-エピーイノソースの単離方法は、実施例 1 に記載した方法に準じて行い、結晶として 1608mg (精製収率 67%) を得た。なお、上記の L-エピーイノソースの反応収率は、上記実施例 1 に準じて次式により求めた。

#### 【数4】

$$\text{反応収率 (\%)} = \frac{\text{精製単離した L-エピーイノソース量}}{\text{緩衝液 400ml 中の反応前の L-エピーイノソース量}} \times 100$$

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 D-キロイノシトールの合成用原料として有用なL-エピーイノソースを安価に効率よく製造できる新方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 ミオーイノシトールをL-エピーイノソースへ変換できる変換能を有する微生物をミオーイノシトールに作用させて、前記ミオーイノシトールをL-エピーイノソースへ変換させてL-エピーイノソースを生成することを特徴とする、L-エピーイノソースの製造方法が提供された。

【書類名】 出願人名義変更届

【整理番号】 11209DA

【提出日】 平成12年 6月 6日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

    【出願番号】 平成11年特許願第159861号

【承継人】

    【識別番号】 000173913

    【氏名又は名称】 財団法人 微生物化学研究会

    【代表者】 水野 伝一

【承継人代理人】

    【識別番号】 100066452

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 八木田 茂

【承継人代理人】

    【識別番号】 100064388

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 浜野 孝雄

【承継人代理人】

    【識別番号】 100067965

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 森田 哲二

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 008796

    【納付金額】 4,200円

【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第159861号
受付番号	50000700922
書類名	出願人名義変更届
担当官	市川 勉 7644
作成日	平成12年 8月10日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	000173913
【住所又は居所】	東京都品川区上大崎3丁目14番23号
【氏名又は名称】	財団法人微生物化学研究会

【承継人代理人】

申請人

【識別番号】	100066452
【住所又は居所】	東京都港区西新橋1丁目1番15号 物産ビル別館 八木田・浜野・森田特許事務所
【氏名又は名称】	八木田 茂

【承継人代理人】

【識別番号】	100064388
【住所又は居所】	東京都港区西新橋1丁目1番15号 物産ビル別館 八木田・浜野・森田特許事務所
【氏名又は名称】	浜野 孝雄

【承継人代理人】

【識別番号】	100067965
【住所又は居所】	東京都港区西新橋1丁目1番15号 物産ビル別館 八木田・浜野・森田特許事務所
【氏名又は名称】	森田 哲二

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000242002]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋本石町4丁目4番20号  
氏 名 北興化学工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000173913]

1. 変更年月日 1990年 8月10日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都品川区上大崎3丁目14番23号

氏 名 財団法人微生物化学研究会

